



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Jun-ichi Nezu et al.
Serial No. : 10/006,611
Filed : November 30, 2001
Title : LKB1 GENE KNOCKOUT ANIMALS

Art Unit : 1645
Examiner : Unknown

48

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from Japanese Patent Application No. 11/153030, filed May 31, 1999, a certified copy of which is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date.

April 11, 2002

Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20415229.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

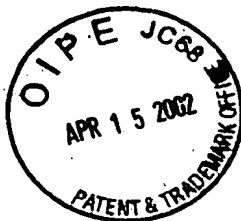
I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit

APRIL 11, 2002
Kathleen Philpot

Signature

KATHLEEN PHILPOT
Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月31日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第153030号

[ST.10/C]:

[JP1999-153030]

出 願 人

Applicant(s):

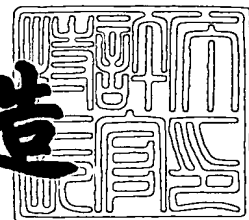
株式会社中外分子医学研究所
中外製薬株式会社

RECEIVED
APR 17 2002
TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月15日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3017607

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-103

【提出日】 平成11年 5月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 根津 淳一

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 奥 飛鳥

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内

 【氏名】 寺社下 浩一

【発明者】

 【住所又は居所】 ドイツ ノイリード市 クラマーストリート 4

 【氏名】 ディーター イー イェネ

【特許出願人】

 【識別番号】 596102791

 【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 LKB1遺伝子ノックアウト動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 内在性LKB1遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物。

【請求項 2】 内在性LKB1遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 3】 ゲノム上のLKB1遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組のloxP配列により挟まれた構造を有する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 4】 げっ歯類である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 5】 マウスである、請求項 4 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 6】 LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物。

【請求項 7】 LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 6 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 8】 げっ歯類である、請求項 6 または 7 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 9】 マウスである、請求項 8 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 1 0】 LKB1をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 1 1】 LKB1をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 1 0 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 1 2】 ゲノム上のLKB1遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組のloxP配列により挟まれた構造を有する、請求項 1 0

または 11 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 13】 Cre 遺伝子を発現可能に保持している、請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 14】 げっ歯類細胞である、請求項 10 から 13 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 15】 マウス細胞である、請求項 14 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 16】 胚性幹細胞である、請求項 10 から 15 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 17】 LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 18】 LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 17 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 19】 請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞において Cre 遺伝子を発現させることによって得られる、請求項 18 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 20】 げっ歯類細胞である、請求項 17 から 19 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 21】 マウス細胞である、請求項 20 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 22】 胚性幹細胞である、請求項 17 から 21 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 23】 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 16 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

【請求項 24】 請求項 6 から 9 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製

方法であって、

(a) 請求項 2 2 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

【請求項 2 5】 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚に Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、および

(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

【請求項 2 6】 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法。

【請求項 2 7】 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre 遺伝子をゲノム上に有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、LKB1 遺伝子の機能が欠損した哺乳動物、およびその作製方法に関する。ヒト LKB1 遺伝子はポイツ・イエーガー症候群の原因遺伝子であり、該哺乳動物は該疾患の治療法や治療薬開発のために利用されうる。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ポイツ・イエーガー症候群 (Peutz-Jeghers Syndrome, MIM 175200, PJS) は、消化管におけるポリポシス症と、粘膜や皮膚における色素斑形成を主な症候とするヒトの遺伝病である。PJS は常染色体優性遺伝形式により遺伝するが、1997 年 Hemminki 等により、PJS 患者家系における連鎖 (リンケージ) 解析からその原因遺伝子は第 19 番染色体 p13.3 領域にマップされることが示された (Hemminki A et al, Nat Genet 1997 Jan; 15(1): 87-90)。この領域には本発明者らが見いだしていた新規セリン/スレオニンキナーゼ LKB1 が存在することから、Jenne 等は

これを原因遺伝子の候補であると考え、PJS患者におけるLKB1(STK11)遺伝子の変異解析を行ったところ、調べた全ての患者においてLKB1遺伝子の変異が存在することが明らかとなった (PCT/JP98-05357; Jenne DE et al, Nat Genet 1998 Jan;18(1):38-43)。さらに、他のグループからも同様の報告が相次いでなされ、現在までに少なくとも60種類以上のLKB1遺伝子変異がPJS患者において見いだされている (Hemminki A et al, Nature 1998 Jan 8;391(6663):184-7; Nakagawa H et al, Hum Genet 1998 Aug;103(2):168-72; Resta N et al, Cancer Res 1998 Nov 1;58(21):4799-801; Ylikorkala A et al, Hum Mol Genet 1999 Jan;8(1):45-51)。さらに本発明者らは、LKB1遺伝子産物が自己リン酸化能を持つキナーゼであり、PJS患者において見いだされたミスセンス変異はキナーゼ活性を失う変異であることの証明を行った (Mehenni H et al, Am J Hum Genet 1998 Dec;63(6):1641-50)。これらのことより、LKB1セリン／スレオニンキナーゼの遺伝子変異による機能欠損がPJSの発症原因であることが確証されるに至っている。

【0003】

また、PJS患者は様々な癌に対する発症リスクが健常人に比較し著しく増加していることが疫学的研究から知られており、このことからその原因遺伝子は癌抑制遺伝子様の活性を持つことが推測されていた。実際、PJSと無関係な散发性の癌においてもLKB1遺伝子の変異がみられることが報告されてきており、一般の散发性癌においてもLKB1遺伝子の不活が関与していることが明らかとなりつつある (Dong SM et al, Cancer Res 1998 Sep 1;58(17):3787-90; Rowan A et al, J Invest Dermatol 1999 Apr;112(4):509-11; Guldberg P et al, Oncogene 1999 Mar 4;18(9):1777-80)。しかし、正常細胞におけるLKB1の具体的な生理機能や、その不活化がポリポーシス症や癌化などを引き起こすメカニズムについては未だ全く不明のままである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、LKB1の機能解析やLKB1の変異に起因する疾患のための薬剤の開発に有用な非ヒト哺乳動物を提供することを課題とする。より詳しくは、LKB1遺伝子の発現が人為的に抑制されたノック

アウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。本発明の好ましい態様においては、内在性LKB1遺伝子を誘導的に欠損させることができる非ヒト哺乳動物を提供する。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、人為的にLKB1遺伝子を欠損させた、または欠損を誘導することが可能な哺乳動物モデルの作製を試みた。具体的には、実施例に詳しく示されるように、マウスLKB1遺伝子（ゲノムDNA、cDNA）のクローニングを行い、これを用いて相同組み換え用のベクターを構築し、これをマウス胚性幹細胞（ES細胞）に導入して組み換えクローンを得て、それをマウス個体に戻すという手法により変異したLKB1遺伝子を持つマウスを得ることに成功した。本発明者等は、該マウスの作成において、Cre-loxPシステム（後述）を利用することにより、時期特異的、また組織特異的にLKB1遺伝子変異を誘発することを可能にした。これにより、従来問題であった目的遺伝子の不活化が胎児性致死を引き起こす可能性を回避した。本発明により得られた哺乳動物（あるいはそれから樹立した細胞株）は、PJSや癌などのLKB1遺伝子の欠損に基づく各種疾患の発症メカニズムを解明するためのツールとして、さらにはこれらの疾患に対する治療法や治療薬の開発に対しても非常に有用なツールであると考えられ、様々な目的に応用されることが期待される。

【0006】

本発明は、LKB1遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された非ヒト哺乳動物およびその作製方法に関し、より具体的には、

- （１） 内在性LKB1遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物、
- （２） 内在性LKB1遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、（１）に記載の非ヒト哺乳動物、
- （３） ゲノム上のLKB1遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも１組のloxP配列により挟まれた構造を有する、（１）または（２）に記

載の非ヒト哺乳動物、

(4) げっ歯類である、(1) から (3) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物

(5) マウスである、(4) に記載の非ヒト哺乳動物、

(6) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物、

(7) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(6) に記載の非ヒト哺乳動物、

(8) げっ歯類である、(6) または (7) に記載の非ヒト哺乳動物、

(9) マウスである、(8) に記載の非ヒト哺乳動物、

(10) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞、

(11) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、(10) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(12) ゲノム上のLKB1遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも1組のloxP配列により挟まれた構造を有する、(10) または (11) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(13) Cre遺伝子を発現可能に保持している、(12) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(14) げっ歯類細胞である、(10) から (13) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(15) マウス細胞である、(14) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(16) 胚性幹細胞である、(10) から (15) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(17) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞、

(18) LKB1をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制

御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(17)に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(19) (12)に記載の非ヒト哺乳動物細胞においてCre遺伝子を発現させることによって得られる、(18)に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(20) げっ歯類細胞である、(17)から(19)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(21) マウス細胞である、(20)に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(22) 胚性幹細胞である、(17)から(21)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(23) (1)から(5)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (16)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(24) (6)から(9)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (22)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(25) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (3)に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚にCre遺伝子を導入し、発現させる工程、および

(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(26) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法、

(27) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre遺伝子をゲノム上に有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法、に関する。

【0007】

なお、本発明において「遺伝子の発現の抑制」には、完全な抑制および部分的な抑制が含まれる。また、特定の環境下での抑制も含まれる。また、2つのアレルの一方の発現が抑制されている場合も含まれる。

【0008】

【発明の実施の形態】

相同組み換え（ノックアウト）用ベクターの構築

LKB1の遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物を作製するためには、まず、LKB1遺伝子をクローニングし、これを基に標的動物における内在性LKB1遺伝子を失活させるための相同組換え用ベクターを構築する。

【0009】

該相同組換え用ベクターは、標的動物の内在性LKB1遺伝子を失活させるために設計された核酸配列を含む。このような核酸配列は、例えば、LKB1遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠失させた核酸配列でもよく、また、LKB1遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列であってもよい。このようにLKB1遺伝子またはその発現制御領域に挿入される他の遺伝子としては、マーカーとしても機能する遺伝子が好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子（G418耐性により選択）やチミジンキナーゼ遺伝子（ガンミクロビル耐性により選択）などの薬剤耐性遺伝子、ジフテリア毒素(DT)A遺伝子などの毒素遺伝子、またはこれらの組み合わせを用いることができる。これら遺伝子のLKB1遺伝子における挿入場所は、標的における内在性LKB1遺伝子の発現を抑制しうる位置であれば特に限定されない。

【0010】

また、該核酸配列は、LKB1遺伝子のイントロンにファージDNA由来のloxP (locus of X-ing-over) 配列を2カ所以上挿入されたものであってもよい。

loxP配列は、部位特異的組み換え酵素の一つであるCre (Causes recombination) リコンビナーゼの認識配列である (Sternberg, N and Hamilton, D. J. Mol. Biol. 150, 467-486, 1981)。Creリコンビナーゼは、2つのloxP配列を認識し、これらの間で部位特異的組み換えを起こすことによりその間の遺伝子を排除する（以下Cre-loxPシステム）。このシステムを用いた応用例を図5に示した。3つの

loxP配列を有する相同組み換え用ベクターを構築し、それを、例えば、胚性肝細胞（ES細胞）に導入して相同組み換え体を得られたならば、このES細胞内にCreを一過性に発現させることにより、コンベンショナルな遺伝子欠失を持つタイプ（タイプ1）と、コンディショナルな遺伝子欠失を持つタイプ（タイプ2）の両タイプのES細胞をさらに作製することが可能である。即ち、3つのloxP配列を有するコンストラクトを用いると、1つの相同組み換え体からCreを発現させることだけで2つの遺伝子型を持つES細胞クローンを作製できるという利点がある。タイプ2のES細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre遺伝子を発現させることによりタイプ1に転換できる。

【0011】

このCre-loxPシステム同様に、FRT (Flp recombinase target) 配列と、それを認識して部位特異的組み換えを起こす酵母由来のFlpリコンビナーゼとの組み合わせを用いてもよい。

【0012】

クローニングしたLKB1遺伝子へのこれらの遺伝子の挿入は、試験管内において、通常のDNA組み換え技法を用いて行うことができる (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。

【0013】

細胞のトランスフェクション

このようにして構築された相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞（例えば、ES細胞）に導入し、該細胞中のLKB1遺伝子との相同組み換えを行う。本発明において用いられる非ヒト哺乳動物細胞としては、その由来する生物に特に制限はないが、好ましくはげっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどである。

【0014】

相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者によく知られた方法、例えば、エレクトロポレーション法を利用することができる。この結果、一部の細胞内においては細胞中のLKB1遺伝子と相同組み換え用ベクターの対応する領域との間で組み換えが生じ、相同組み換え用ベクター中に構築されていた遺伝子型

と野生型の遺伝子とが置き換わることとなる。このようにしてマーカー遺伝子や loxP 配列が挿入された LKB1 遺伝子を持つ細胞を得ることができる。

【0015】

相同組換えベクターにおいてマーカー遺伝子を利用している場合には、所望の相同組換えが行なわれた細胞は、LKB1 遺伝子が失活し、同時にマーカー遺伝子を得ることとなるので、このマーカー遺伝子を指標とすることにより選抜を行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子として、薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、ベクター導入後の細胞を、致死濃度の薬剤の存在下で培養することにより、所望の相同組換えが行なわれた細胞を選抜することができる。

【0016】

ただし、Cre-loxP システムを用いた場合は、loxP 配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されることがあるため、その場合には、細胞内において LKB1 遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、LKB1 遺伝子の失活は、Cre リコンビナーゼを該細胞中で発現させ、loxP 配列に挟まれた領域を排除することにより成し遂げられる。

【0017】

細胞における Cre リコンビナーゼの発現は、例えば、アデノウイルスなどの発現ベクターを利用する方法や、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターで Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物とを交配することにより行うことができる。Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物との交配では、一回目の交配では、LKB1 遺伝子の一方のみが欠失する（ヘテロである）ノックアウト動物が得られるが、交配を繰り返すことにより、LKB1 遺伝子がすべて欠失するノックアウト動物を得ることができる。

【0018】

胚への注入および胚の移植

本発明において ES 細胞を用いた場合には、これを胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製し、さらに偽妊娠させた哺乳動物の子宮角に移植して産仔を得る。注入に用いる胚盤胞は妊娠した雌の子宮を灌流することによって得ることが

できる。ES細胞が発生分化中の胚に取り込まれたか否かを個体作製後に検定できるようにするために、作製された個体の外部的特徴（例えば、毛色）がES細胞に由来する部分と胚盤胞に由来する部分とで異なるように、胚盤胞を選択することが好ましい。

【0019】

次に、こうして得たキメラ動物を適当な系統の同種動物と交配させることにより産仔を得る。キメラ動物の生殖細胞が相同性組み換え体ES細胞に由来すればLKB1遺伝子が破壊された産仔を得ることができる。ただし、Cre-loxPシステムを用いた場合は、loxP配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されていることもあるので、その場合LKB1遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、Creリコンビナーゼを体細胞、あるいは受精卵などの生殖細胞に発現させることによってLKB1遺伝子を失活させることができる。

【0020】

本発明においてES細胞を用いず、他の体細胞を用いる場合は、体細胞クローン動物の作製技術に従ってノックアウト動物の作製を行うことができる。具体的には、例えば

- 1) 繊維芽細胞等のES細胞以外の細胞を用いて、ES細胞の場合と同様な方法によって相同組換え法により遺伝子に変異が導入された細胞を樹立する。
- 2) この細胞より、体細胞クローン動物作製の技術を応用し、変異遺伝子を持つ動物を作成する (Wilmut I. et al., 1997, ; Nature 385: 810-803; Wakayama, T. et al., 1998, Nature 394: 369-374)。
- 3) こうして生まれた変異遺伝子を持つ動物は、ES細胞を用いた場合のF1マウスに相当し、それ以降はES細胞を用いた場合と同様に使用することができる。

【0021】

ノックアウト動物の用途

本発明のノックアウト動物は、LKB1遺伝子の機能不全に起因する種々の疾患に対する治療薬や治療方法の開発に有用である。例えば、本発明のノックアウト動物に被検化合物を投与し、ポリープ形成、癌発生、色素斑形成に対する影響を検

査し、所望の効果を示す化合物を選択する。

【0022】

また、ノックアウト動物から調製された細胞を用いた治療薬や治療方法の開発も考えられる。例えば、本発明のノックアウト動物の胚などから細胞を調製し、被検化合物を添加し、細胞の増殖、寒天中などにおけるコロニー形成能、フォーカス形成能、移動能などに対する影響を調べる。その結果、所望の効果を示す化合物を選択する。細胞は、初代培養細胞を用いることもできれば、株化した細胞を作製して用いることもできる。以上によりスクリーニングされた化合物は医薬品の候補となる。

【0023】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0024】

【実施例1】 LKB1遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウスLKB1遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウスLKB1ゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノムDNAを用い、Yagiらの報告 (Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993) に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびジフテリア毒素A遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子の両端及びイントロン8の計3カ所に同じ向きになるようにloxP配列を挿入し、Creリコンビナーゼによる部位特異的相同組み換えが可能となるようにした。以下具体的に説明する。

【0025】

A. マウスLKB1遺伝子のクローニング

ヒトLKB1 cDNAの配列を用いデータベースをサーチすることにより、これと非常に高い相同性を示すマウス由来のEST (Expressed Sequence Tag) をいくつか見いだした。これらの配列からMPJ 85プライマー (5' GATGAATTCCGAAGGACAGAGGACAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 4) 及びLK E2プライマー (5' GATGAATTCTTAGAGGTCTTCT

TCTGAGATGAGCTTCTGCTCCTGCTGCTGCAGGCCGA 3' : 配列番号 : 5) を作製し、マウス 17 日目胚由来 Marathon ReadyTM cDNA (CLONTECH) を鋳型とした PCR を行い、マウス LKB1 の全オープンリーディングフレーム (ORF) を含む cDNA を増幅した。これをプライマーの両端に付加した EcoRI で切断し、pcDNA3 ベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。複数のクローンをシーケンシングすることにより遺伝子の配列の決定を行った。また、マウス LKB1 cDNA の 5' 側は 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends 法) によりクローニングした。すなわち、マウス 17 日目胚由来 Marathon ReadyTM cDNA (CLONTECH) を鋳型とし、MPJ15 プライマー (5' TGC GCAG CTTTTCTTCTTGAGGA 3' : 配列番号 : 6) とキットに添付されたアダプタープライマー (AP1 プライマー) を用いた PCR を行い、増幅された約 400bp の断片を TA クローニング法にて pT7Blue-T ベクター (Novagen) にサブクローニングした。得られたサブクローンを複数シーケンシングすることによりマウス LKB1 cDNA の 5' 側の配列を決定した。こうして得られたマウス LKB1 cDNA の配列を配列番号 : 1 に、またそのアミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す。

【 0 0 2 6 】

マウス LKB1 ゲノム DNA は以下のようにしてクローニングした。

ドイツヒトゲノムプロジェクトリソースセンター (RZPD) より、マウス (129/01a ストレイン) ゲノム DNA ライブラリーをグリッドしたフィルターを購入した。このライブラリーは以下のような特徴を有する。

ゲノム DNA : 129/01a マウスの脾臓細胞より調製した DNA。Mbo I による パーシャル切断。

ベクター : コスミドベクター lawrist 7。

【 0 0 2 7 】

ヒト LKB1 cDNA をプローブとし、通常の条件でこのフィルターに対してハイブリダイゼーションと洗浄を行った。その結果、2 つのクローン、P2436Q3 (クローン 243) 及び L07209Q3 (クローン 072) において陽性シグナルが認められた。これらのクローンを RZPD から購入し、さらに PCR によってマウス LKB1 遺伝子を含んでいることを確認した。すなわち、これらのコスミドクローンを保持する大腸菌を 30 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地で培養し、QIAGEN maxi キット (Qiagen) を

用いたアルカリSDS法によりコスミドDNAを調製した。コスミドDNAを鋳型とし、DJ666プライマー(5' GGTGATGGAGTACTGCGTGTG 3' : 配列番号 : 7)及びMPJ18プライマー(5' GGTGAAGTCTCCTCTCCCAATGTT 3' : 配列番号 : 8)を用いたPCRを行い、マウスLKB1遺伝子の断片が増幅されることを確認した。

【0028】

これらのコスミドDNAから、マウスLKB1 cDNAの配列などをもとに作製したプライマーを用いたPCRによりマウスLKB1遺伝子をいくつかの断片に分けて増幅し、それらを直接シーケンシングすることにより塩基配列を決定した。得られたゲノムDNA配列をcDNAの配列と比較することにより、エキソン/イントロン構造を決定した。その結果、両クローンともイントロン1の途中からエキソン10までを含んでおり、クローン072の方が数kbp長いイントロン1を含んでいることが明らかとなった(図1)。次に、イントロン1内に作製したMPJ67プライマー(5' ACTGCAGCTGACCCAAGCCAGGAT 3' : 配列番号 : 9)とマウスLKB1 cDNAの5' 非翻訳領域(UTR)中に作製したMPJ13プライマー(5' CGAAGGACAGAGGACAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 10)を用い、マウスゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、残りのイントロン1と、エキソン1を含む断片をクローニングした。以上の様にして、マウスLKB1ゲノムDNAのエキソン1からエキソン10のクローニングを行った。マウスLKB1遺伝子のエキソン/イントロン構造を図1に模式的に示す。また、エキソン2からエキソン10までの塩基配列を配列番号 : 3に示す。この塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表したものを、図2、3、4に示す。

【0029】

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローン072コスミドDNAに含まれるマウスLKB1遺伝子を、HindIIIサイトによって分割される4つの断片(断片1~4、図1)に分けてそれぞれプラスミドベクターにサブクローニングを行った。すなわち、まずクローン072コスミドDNAをSfiIで切断し、この切断末端をTaKaRa DNA blunting kit(TaKaRa)を用いた方法により平滑末端化した。これをさらにHindIIIで切断し、生じた約8kbpの断片(断片1)をpBluescript IIベクター(TOYOBO)のSmaI/HindIIIサイトに組み込み、クローンMGF-10を得た。また、クローン072コスミドDNAをHindIIIによって切断し

、生じた約1kbpの2つの断片（断片3、断片4）、及び約4kbpの断片（断片2）をそれぞれpUC18ベクター（Pharmacia）のHindIIIサイトに組み込み、クローンMGG-1（断片2）、クローンMGD-2（断片3）、及びクローンMGD-3（断片4）を得た。

【 0 0 3 0 】

これらのサブクローンから以下のようにして相同組み換え用のベクターを構築した。まず、クローンMGF-10からNotI/XhoIによって切り出される断片1を、ジフテリア毒素A遺伝子、及びmRNA不安定化配列(A+T)を持つプラスミド(DT-AカセットB, Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993)のNotI/XhoIサイトに挿入し、クローンLT1を得た。クローンMGG-1のAvaIIIとベクター中のEcoRIサイトの間にF23合成リンカー（図6）（上段：配列番号：11、下段：配列番号：12）を挿入し、クローンLT2を得た。LT2からHindIII/ClaIで切り出される断片（断片2）をクローンLT1のHindIII/ClaIサイトに挿入し、LT4を得た。pBluescript IIベクターのSpeI/XhoIサイトにloxP2合成リンカー（図6）（上段：配列番号：13、下段：配列番号：14）を挿入したクローンloxP2を作製し、このEcoRI/BamHIサイトにpolyA添加シグナルを持たないネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、両側を2つのloxP配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子のカセット、クローンloxP2/neo-を得た。このクローンからHindIIIによりネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、LT4の断片1と断片2の間（イントロン1）のHindIIIサイトに挿入し、クローンLT-5を得た。クローンMGD-2を鋳型とし、LOXP3 A1プライマー（5' GATGTTCCACCTCGAGCCCAGGCTCCAGAGGTCAGT 3'：配列番号：15）及びLOXP3 S3プライマー（5' GATCTCGAGATCGATGGTACCGGTGTTCCACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGTCCACTGTGTCTGCAGGT 3'：配列番号：16）を用いたPCRにより、断片3の5'側にloxP配列とXhoI/ClaI/KpnI/Cfr10Iサイトを付加した断片を増幅し、これをpBluescript IIベクターのXhoIサイトに挿入し、クローンLT3を得た。最後に、クローンLT3より5'側にloxP配列を持つ断片3をClaI/XhoIによって切り出し、クローンLT5中の断片2の3'側のClaI/XhoIサイトに挿入することにより相同組み換え用ベクターLT6を得た。

【 0 0 3 1 】

このベクターは以下のような特徴を持つ（図7）。

- (i) 第1イントロンに、loxP配列を両端に持つネオマイシン耐性遺伝子が、そして第8イントロン中にはもう一つのloxP配列が挿入されている。
- (ii) 第8イントロン中に挿入されたloxP配列にはKpnIサイトが付加されており、このベクター由来の変異アレルをサザンブロットで見分けることができる。
- (iii) ネガティブ選択用マーカー遺伝子としてジフテリア毒素A遺伝子を持つ。
- (iv) 野生型LKB1遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が約7kb、ネオマイシン耐性遺伝子から第8イントロンのloxP配列までが約4kb、そして第8イントロンのloxP配列から下流が約0.9kbである。

【0032】

〔実施例2〕 相同組み換えによる変異LKB1遺伝子を持つES細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウスES細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON社The Mouse Kit) に導入し、次いでG418により選択培養を行った。得られたG418耐性コロニーについて、PCRおよびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

【0033】

相同組み換え用ベクター (LT6) DNA 60 μ gをNotIで切断することにより線状化し、精製した。このDNAをマウスES細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON社The Mouse Kit) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (LEXICON社The Mouse Kit ESQPBS) に懸濁し、Field Strength 575V/cm、Capacitance 500 μ Fの条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から終濃度300 μ g/mlのG418 (Genetis, Sigma) で選択培養を行った。

【0034】

ES細胞の培養には、ダルベッコ修正イーグル培養液 (GIBCO DMEM 11965-092) に終濃度15%の牛胎児血清 (FBS)、終濃度2mMのL-グルタミン (GIBCO 25030-081)、終濃度50U/mlのペニシリンと終濃度50 μ g/mlのストレプトマイシンを添加したES細胞用培地を用いた。

【0035】

また、ES細胞用のフィーダー細胞としてはESQ Feeder cells (LEXICON社The

Mouse Kit) を用い、培養液はESQ DMEMに終濃度7%のFBSを添加したものを用いた。ESQ Feeder cells (5×10^7 細胞/バイアル) を、37℃で急速融解後、フィーダー用培地で細胞数 4.4×10^5 cells/mlに調整し、あらかじめゼラチンコート (LEXICON社The Mouse Kit ESQ Gelatin) した培養器に、100mmφディッシュの場合は12ml、60mmφディッシュの場合は4ml、6穴プレートの場合は2ml/穴、24穴プレートの場合は0.5ml/穴、そして96穴プレートの場合は75 μ l/穴ずつ分注した。以上のように作製したフィーダー細胞は3週間以内に使用した。

【0036】

遺伝子導入後11日目から、以下のようにして、出現したG418耐性コロニーを96穴のマイクロプレートに継代した。すなわち、マイクロピペットを用いてG418耐性コロニーを30 μ lのTE (Gibco Trypsin-EDTA 25200-072) 溶液を含む96穴のマイクロプレート (Corning 25860MP) に移し換え、数分間処理した後、70 μ lのES細胞培養用培地を加え、ピペティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を96穴のマイクロプレート (Falcon 3072) に移し換え培養を継続した。3日後、96穴のマイクロプレート上の細胞がコンフルエントに達した段階で、以下のようにして細胞を2つに分割した。すなわち、細胞にTEを25 μ l加え分散させ、ES細胞用培地を25 μ l加えピペティングすることによって単一細胞にした後、2×Freezing medium (LEXICON社The Mouse Kit ESQ DMEM:ESQ FBS:DMSO=2:2:1) を50 μ l加え、その20 μ lをES細胞用培地150 μ lの入ったゼラチンコートした96穴マイクロプレート (Iwaki 4860-020) に継代し、PCRによる相同組み換え体検定用のDNAを抽出するために培養した。残りのES細胞には、流動パラフィン100 μ l (0.2 μ mのフィルターで濾過滅菌したもの) を加え、-80℃で凍結保存した。尚、DNA抽出用のES細胞の培養にはフィーダー細胞は用いず、その他のES細胞の培養には全てフィーダー細胞を用いて行った。相同組み換え体の検定は、PCRによって以下の通りに行った。すなわち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した96穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、Lysis buffer (10x Taq buffer 5 μ l、5% NP-40 5 μ l、Proteinase K 4 μ l、H₂O 36 μ l)を加え、55℃で2時間加温した。溶解したサンプルを0.5mlチューブに回収し、95℃で15分間処理した後10,000rpmで10～15分間遠心し、その上清1 μ lをPCR用の鋳型DNAとして用いた。

【0037】

PCRのプライマーは、相同組み換え用ベクター上の3'側のloxPと、相同組み換え用ベクターに含まれないエクソン10との間、約2.1kbが増幅されるように設計した。

すなわち、第8イントロンに挿入したloxP配列を含むLOXP3 S2プライマー (5' CCGGTGTTCCACATAACTTC 3' : 配列番号 : 17) 及び第10エクソンに位置するMPJ37プライマー (5' GTTTCCTCAAGCTTTATTTATTGCC 3' : 配列番号 : 18) を用いて、以下の条件でPCRを行った。

【0038】

反応液組成

10 x ExTaqバッファー (TaKaRa) 5 μ l
 2.5mM dNTPs 4 μ l
 ExTaq (TaKaRa) 0.5 μ l
 20 μ M LOXP3 S2プライマー 1 μ l
 20 μ M MPJ37プライマー 1 μ l
 サンプル 1 μ l
 H₂O 37.5 μ l

反応条件

94℃、2分 → (94℃、30秒 → 68℃、4分) x 36サイクル → 72℃、10分

【0039】

PCRの結果から相同組み換え体であると考えられたクローンについては、さらにサザンブロットによる確認を行った。すなわち、ES細胞から調製したゲノムDNAを制限酵素KpnIで消化し、0.8%アガロース電気泳動後Hybond N+ポジティブチャージナイロンフィルター (Amersham) に転写し、第9、10エクソンを含む約700bpの断片 (プローブ1) をプローブとし、ハイブリダイゼーションを行った。プローブ1は、クローン072コスミドDNAを鋳型とし、MPJ22プライマー (5' CAGCAGCAAGG TGAAGCCAGAAGG 3' : 配列番号 : 19) 及びMPJ37プライマー (配列番号 : 18)

(前出) を用いてPCRによって増幅して得た。ハイブリダイゼーションはExpress HybTM Hybridization solution (CLONTECH) を用い、メーカー推奨の方法に従って

行った。相同組み換えを起こしたアリルは、loxP配列に人工的に付加されたKpnI サイトのため、野生型アリル由来のバンドよりも約2.6kb短いバンドとして検出され、このバンドの有無により相同組み換え体かどうかを判断した。相同組み換え体クローンは、調べたG418耐性クローン562個中4個（クローン236、クローン256、クローン260、クローン358）であった。

尚、PCRの検査成績とサザンブロット解析による成績は完全に一致した（図8）。

【0040】

PCR及びサザンブロット解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった96穴プレートを37℃に温めることにより融解し、24穴プレートに継代した。この24穴プレートを24時間、37℃で培養後、DMSOと流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが75～90%コンフルエントに達した時点で24穴から6穴プレートに継代した。さらに、6穴プレートに75～90%コンフルエントまで増殖したものが2穴分得られたところで、1穴分は凍結保存し、残りの1穴分は胚盤胞への注入及びDNA抽出に使用した。

【0041】

凍結保存は以下の如く行った。すなわち、細胞をESQ PBSで2回リンスした後、0.5mlのESQ Trypsin (LEXICON社The Mouse Kit) を加え、37℃で15～20分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに0.5mlのES Cell mediumを加え、35～40回ピペッティングを行いES細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を15ml遠心チューブに移し、さらに1mlのES Cell Mediumでウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを1,000rpmで7分間遠心し、培地を取り除き 0.25ml ES Cell Medium に再懸濁し、0.25mlの2 x Freezing medium を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身に移し、-80℃で凍らせ、液体窒素中で保存した。

胚盤胞への注入及びDNA抽出用の細胞は、ES細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を胚盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれゼラチンコートした60mmディッシュに継代した。前者は細胞がコンフルエントにまで増殖したところでサザンブロット解析用のゲノムDNAを抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで3本に分けて凍結した。

【 0 0 4 2 】

〔実施例 3〕 組み換え LKB1 遺伝子を持つ ES 細胞によるキメラマウスの作製
 相同組み換えが確認された ES 細胞クローンについて、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞を宿主胚としてキメラ胚を作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、妊娠 2 日目に、100 μ M EDTA を添加した Whitten's 培地で、卵管と子宮を灌流することによって行った。8 細胞期胚または桑実胚を 24 時間 Whitten's 培地で培養し、得られた胚盤胞を注入に用いた。注入に用いた ES 細胞は、継代してから 2 あるいは 3 日目に TE 処理により分散させ、顕微操作に供するまで 4℃ で静置した。

【 0 0 4 3 】

ES 細胞の注入用ピペットとしては、Cook IVF 社製の polar body extrusion pipette (内径約 20 μ m) を用いた。胚保定用ピペットとしては、外径 1mm の微小ガラス管 (NARISHIGE) を微小電極作製器 (Sutter 社 P-98/IVF) を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォージ (De Fonburun) を用いて外径 50~100 μ m の部分で切断し、さらに口径を 10~20 μ m に加工したものを用了。

【 0 0 4 4 】

注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約 5mm の部分を約 30 度曲げて、マイクロマニピュレーター (LEITZ) に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドガラスにカバーガラスを蜜蝋で接着したものをを用い、その上に約 20 μ l の 0.3% BSA を加えた Hepes-buffered Whitten's 培地のドロップを 2 個置き、上面を流動パラフィン (ナカライテスク 261-37 SP) で覆った。一方のドロップには、約 100 個の ES 細胞を入れ、他方には拡張胚盤胞を 10~15 個入れ、胚 1 個あたり 10~15 個の ES 細胞を注入した。

【 0 0 4 5 】

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2 時間の培養後、偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に保育させた。

【 0 0 4 6 】

C57BL/6J 系マウスの胚盤胞 59 個に、クローン 358 ES 細胞を注入した結果、55 個

が生存した（成功率93%）。この55個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、28匹の産仔が得られた。相同組み換え体に由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた28匹の産仔のうち、毛色からキメラマウスと判定できたのは23匹であり、そのうちの21匹が形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおける毛色から判断したES細胞の寄与率は20～100%の幅であり、寄与率が60%未満のものが2例、60%以上90%未満のものが4例、90%以上のものが15例であった。同様に、クローン236 ES細胞及びクローン256 ES細胞からもキメラマウスが得られた。これらのキメラマウス作出に関する成績を表1に示した。

【0047】

【表1】

キメラマウス作出成績表

ESクロー ン	ホスト胚 系統	注入胚／操 作 数	%	移植胚数	着床数	着床数 (%)	産仔数		毛色キメラ数			寄与率
							Total (%)		Total (%)	♂	♀	
236	B6	70 / 74	95%	70	46	66%	24 34%	17	12 50%	10	2	♂90%以上6匹、90%未満～60%未満 2匹、♀60%未満2匹
256	B6	57 / 58	98%	57	44	77%	20 39%	11	4 18%	4	0	♂90%以上3匹、90%未満～60%未満 2匹
260	B6	40 / 45	89%	40	13	33%	5 13%	4	0 0%	—	—	
358	B6	55 / 59	93%	55	—	—	28 51%	22	23 82%	21	2	♂90%以上15匹、90%未満～60%未満 満2匹、♀60%未満2匹

【 0 0 4 8 】

〔実施例 4〕 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定

実施例 3 のキメラマウスを C57BL/6J 系マウスと交配させ、ES 細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞が ES 細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野性色を呈し、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞に由来していればブラック色を呈することとなる。

【 0 0 4 9 】

クローン 358 ES 細胞については、性成熟に達する前に死亡した 5 例を除いた 16 例 (No. 358-1~16) のキメラマウスのうち、6 例 (No. 358-1、2、5、7、8、13) において、ES 細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、7/9、2/2、3/14、8/8、5/16、2/11 であった。またクローン 256 ES 細胞についても、4 例 (No. 256-1~4) のキメラマウスのうち 2 例 (No. 256-1、2) において ES 細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、2/3 と 1/13 であった。

【 0 0 5 0 】

次に、これらの野性色マウスのうち 27 匹について尾の一部から DNA を抽出し、PCR 及びサザンブロットにより、変異 LKB1 アリルが伝達されているかを調べた。その結果、クローン 358 ES 細胞由来の産仔は 10 例において、そしてクローン 256 ES 細胞由来の産仔では 1 例において変異 LKB1 アリルが伝達されていることが確認された (図 9)。

以上述べた変異アリル伝達の成績を表 2 に示した。

【 0 0 5 1 】

【表 2】

変異アリル伝達の成績表

キメラマウス No.	ESクローン	産仔数	陽性数		
			毛色	PCR	サザンプロット
358-1	358	9	7	0	-
358-2	358	2	2	2	2
358-3	358	6	0	-	-
358-4	358	3	0	-	-
358-5	358	14	3	0	-
358-6	358	14	0	-	-
358-7	358	8	8	3	3
358-8	358	16	5	5	5
358-9	358	1	0	-	-
358-10	358	8	0	-	-
358-11	358	-	-	-	-
358-12	358	6	-	-	-
358-13	358	11	2	-	-
358-14	358	-	-	-	-
358-15	358	-	-	-	-
358-16	358	-	-	-	-
256-1	256	3	2	1	1
256-2	256	13	1	0	-
256-3	256	7	0	-	-
256-4	256	-	-	-	-
総計		121	30	11	11

【0052】

[実施例 5] Cre-loxPシステムによるLKB1遺伝子の失活

Cre遺伝子を一過性にES細胞内で発現させることにより、コンペンショナルな遺伝子欠失と、コンディショナルな遺伝子欠失の両タイプのES細胞を作製できる (Taniguchi, M et al. Nucleic Acids Research 26:679-680, 1998)。コンディショナルなタイプ (タイプ2、図5) のES細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre遺伝子が発現させることによりLKB1遺伝子を失活させることができる。

【0053】

また、このシステムを利用することにより、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターでCreの発現を制御したトランスジェニックマウスと交配したり、Cre遺伝子を発現するように構築したアデノウイルスなどを感染させることにより、Cre遺伝子が発現している細胞において特異的にloxP配列に挟まれたLKB1遺伝子のエクソン2から8に渡る領域を欠失させ、LKB1遺伝子の機能を欠損させることができる。このようにCre-loxPシステムにおいては、Cre遺伝子を発現させることにより、ES細胞、マウス個体、あるいはマウス受精卵において、時期特異的、あるいは組織特異的にloxP配列によって挟まれた遺伝子を組み換えによって欠失させることが可能である。

【0054】

【発明の効果】

本発明により、LKB1遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物においては、Cre-loxPシステムを利用することにより、LKB1遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊することができ、従来大きな問題点となっていた、目的遺伝子の欠失が胎性致死を招きその後の機能解析が不可能である場合においても、それを回避することが可能であると考えられる。本発明の哺乳動物は、ヒトPJSや、その他癌などのLKB1遺伝子の欠損に基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> LKB1 gene knock out animal

<130> C2-103

<140>

<141>

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1795

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (51)..(1358)

<400> 1

aattcggatc caaggcggcc cgaaggacag aggacaaaga gtgggccagg atg gac 56

Met Asp

1

gtg gcg gac ccc gag ccg ttg ggc ctt ttc tcc gag ggc gag ctg atg 104

Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu Leu Met

5

10

15

tcg gtg ggc atg gac acc ttc atc cac cgc atc gac tcc acc gag gta 152

Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr Glu Val

20

25

30

atc tac cag ccg cgc cgc aaa cgc gcc aag ctc atc ggc aag tac ctg 200

Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys Tyr Leu

35

40

45

50

atg ggg gac ctg ctc ggg gag ggc tcg tac ggc aag gtg aag gag gtg 248

Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys Glu Val

55

60

65

ctg gac tcc gag acc tta tgc cgc agg gcg gtc aag atc ctc aag aag 296

Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu Lys Lys

70

75

80

aaa aag ctg cgc agg atc ccc aat gga gag gcc aac gtc aag aag gag 344

Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys Lys Glu

85

90

95

atc cag ctg ctg cgg cgg ctg cgg cat cgg aat gtg atc cag ctt gtg 392

Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln Leu Val

100

105

110

gac gtg ctg tac aat gag gag aag cag aag atg tat atg gtg atg gag 440

Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val Met Glu

115

120

125

130

tac tgc gta tgt ggc atg cag gag atg ctg gac agt gtg ccg gag aag 488

Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro Glu Lys

135

140

145

cgc ttc cct gtg tgc caa gct cat ggg tac ttc cgc cag ctg att gac 536
Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu Ile Asp

150

155

160

ggc ctg gaa tac cta cac agc cag ggc att gtt cac aag gac atc aag 584
Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp Ile Lys

165

170

175

ccg ggc aac ctg cta ctc acc acc aat ggc aca ctc aag atc tcc gac 632
Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile Ser Asp

180

185

190

ctc ggt gtt gcc gag gcc ctg cac cct ttc gct gtg gat gac acc tgc 680
Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp Thr Cys

195

200

205

210

cgg aca agc cag ggc tcc ccg gcc ttc cag cct cct gag att gcc aat 728
Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile Ala Asn

215

220

225

gga ctg gac acc ttt tca ggt ttc aag gtg gac atc tgg tca gct ggg 776
Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser Ala Gly

230

235

240

gtc aca ctt tac aac atc acc acg ggc ctg tac cca ttt gag ggg gac 824
Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu Gly Asp

245

250

255

aat atc tac aag ctc ttt gag aac att ggg aga gga gac ttc acc atc 872

Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe Thr Ile

260

265

270

cct tgt gac tgc ggc cca cca ctc tct gac cta ctc cga ggg atg ttg 920

Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly Met Leu

275

280

285

290

gag tat gag ccg gcc aag agg ttc tcc atc cga cag att agg cag cac 968

Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg Gln His

295

300

305

agc tgg ttc cgg aag aaa cac cct ctg gct gag gcg ctc gta cct atc 1016

Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val Pro Ile

310

315

320

cca cca agc cca gac act aag gac cgc tgg cgc agt atg act gta gtg 1064

Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr Val Val

325

330

335

ccc tac ctg gag gac ctg cat ggc cgt gcg gag gag gag gag gag gaa 1112

Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu

340

345

350

gac ttg ttt gac att gag gac ggc att atc tac acc cag gac ttc aca 1160

Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr

355

360

365

370

gtg cct gga cag gtc ctg gaa gag gaa gtg ggt cag aat gga cag agc 1208
Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Gln Ser

375

380

385

cac agt ttg ccc aag gct gtt tgt gtg aat ggc aca gag ccc cag ctc 1256
His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro Gln Leu

390

395

400

agc agc aag gtg aag cca gaa ggc cga cct ggc acc gcc aac cct gcg 1304
Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn Pro Ala

405

410

415

cgc aag gtg tgc tcc agc aac aag atc cgc cgg ctc tcg gcc tgc aag 1352
Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys

420

425

430

cag cag tgactgagc ctacagtgtg tcacaggat ctctgggcag gtgtccctgc 1408
Gln Gln

435

aaggctgggt ttccaggcc tgcctgtcca ctacttcgg gacgttggag ccgagggcgg 1468

acctgctgcc ccagaagcac tttatgtcga gaccactggc cggccttgcc tgcattgccg 1528

cctgcgagcc tcgtgtctt tgggttggt tcttttttt taataaaaca ggtggatttg 1588

agctatggct atgaggtgt ttggaaatat ggagcaggcg gggcacaggg tggcctgcag 1648

agaaaaccag agcaaaaa tatgcagaga catttatgat taaccagaca acacgaccaa 1708

ccacagaggg cgcagggcag ggagtgggca ggcactcaca gcgagtctgc cctatctttt 1768

ggcaataaat aaagcttggg aaacttg 1795

<210> 2

<211> 436

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Asp Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu

1 5 10 15

Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr

20 25 30

Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys

35 40 45

Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys

50 55 60

Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu

65 70 75 80

Lys Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys

85 90 95

Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln

100

105

110

Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val

115

120

125

Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro

130

135

140

Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu

145

150

155

160

Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp

165

170

175

Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile

180

185

190

Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp

195

200

205

Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile

210

215

220

Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser

225

230

235

240

Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu

245

250

255

Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe

260

265

270

Thr Ile Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly

275

280

285

Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg

290

295

300

Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val

305

310

315

320

Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr

325

330

335

Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu

340

345

350

Glu Glu Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp

355

360

365

Phe Thr Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly

370

375

380

Gln Ser His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro

385

390

395

400

Gln Leu Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn

405

410

415

Pro Ala Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala

420

425

430

Cys Lys Gln Gln

435

<210> 3

<211> 5876

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> exon

<222> (1)..(84)

<220>

<221> intron

<222> (85)..(677)

<220>

<221> exon

<222> (678)..(767)

<220>

<221> intron

<222> (768)..(1231)

<220>

<221> exon

<222> (1232)..(1364)

<220>

<221> intron

<222> (1365)..(1431)

<220>

<221> exon

<222> (1432)..(1568)

<220>

<221> intron

<222> (1569)..(1852)

<220>

<221> exon

<222> (1853)..(1980)

<220>

<221> intron

<222> (1981)..(2243)

<220>

<221> exon

<222> (2244)..(2301)

<220>

<221> intron

<222> (2302)..(3102)

<220>

<221> exon

<222> (3103)..(3299)

<220>

<221> intron

<222> (3300)..(5103)

<220>

<221> exon

<222> (5104)..(5310)

<220>

<221> intron

<222> (5311)..(5454)

<220>

<221> exon

<222> (5455)..(5876)

<400> 3

ggagatccag ctgctgcggc ggctgcggca tcggaatgtg atccagcttg tggacgtgct 60

gtacaatgag gagaagcaga agatatatcc tgtgggtgga gtgggctggg gtggcccctg 120

tgttaggggc tggaagcctt ctgcaaggcc tctggcagca atagtgtac atgtcatcct 180
 gtggtgcctg tcagctcatc aggcagggga gcaaggcatg gggcttcac ctggtgccag 240
 cctgttctga gcagtgtggc tgggactggg catggcctca cagggacttg gggcctatgt 300
 acattgacag ggccccggct ggttctagag gtttccatgc tgccccctcc cagaggtaga 360
 ggttgacag cctacgttgc atctgggcag tcctgggagc attctgagaa cccagtgtccc 420
 tgcagcccca actcctggta cccatctctc cctgtggcta gtacaccagc tgatttcagt 480
 cctgttgtaa tctatgtga ctccatgtgg tccaagtcac tgtggtggtc ttgtggaccc 540
 tgtgagtact gatagggagc gcagaatggc gggagagcag agtggtggtg gtctgttggc 600
 ccagcggggc cctccagacc actgttgcta ggagcagggc tcctgggctt ggtgtgctgc 660
 tttccttagc gccctacgta tatggtgatg gactactgcg tatgtggcat gcaggagatg 720
 ctggacagtg tgccggagaa gcgcttcct gtgtgccaag ctcatgggtg agtgcctgc 780
 tgggtgcagg aggagcagcc attgtcagga aaccaggtg tttctgggcc cccagttttt 840
 aaccagcca atgtgcttag ggttaccctc ttgttaggcc ctgtggtccc gctgccctgc 900
 agagccatag tgggtctgag tcctgttcag tgctcccagg ttcagcagaa tcacatcccc 960

tggttagcag agaacaaagg gaagggaagg gaaggaagca agccagaggg gaaacctggc 1020

tccctgggcc tgggcagcag tgactgccag ttgccctgtg taattttagt ggcccagcct 1080

tctgactctc aggtctgttt gcctgagccc taaacatcta tcaccttgta ggccaggtct 1140

catgagtctc ccaaacttca tatcagactt atgtaggtac catggtatgg gctgagacac 1200

tgtggggcct gagccagtcc caccattca ggtacttccg ccagctgatt gacggcctgg 1260

aatacctaca cagccagggc attgttcaca aggacatcaa gccgggcaac ctgctactca 1320

ccaccaatgg cacactcaag atctccgacc tcggtgttgc cgaggtaggc accatgtgca 1380

gggatcatgg gccgcttctc ctgagctgcc ctgactctca ctgccctgca ggccctgcac 1440

cctttcgctg tggatgacac ctgccggaca agccagggtc ccccgccctt ccagcctcct 1500

gagattgcca atggactgga caccttttca gttttcaagg tggacatctg gtcagctggg 1560

gtcacactgt aagtgtcttg tgtgtaccct gtagcagatg gggggctgtg ggttttccct 1620

agtgttcttg ggcccttttg cccacagtgt gtggctagca ggttggacat tccaggtctg 1680

tgggtgtggt tcctaccct accccacccc actccacagg gttttgcttg cacacagatg 1740

taggtgccat gactgcacat ctaccagtta acatgtgtcc tgtctgggag ttggggcacc 1800

tgtcctctgg tctccagtgt ggccagcact gacactcttt tcctatgtga agttacaaca 1860

tcaccacggg cctgtacca tttagggggg acaatatcta caagctcttt gagaacattg 1920

ggagaggaga cttcaccatc ccttgtgact gcggcccacc actctctgac ctactccgag 1980

gtgggcatct ctaaatacacc caaatgttag gacagcaagg gacagagccc ctggtctgga 2040

ggggttctga ccttactgtc aggacagcct ttgtccgcca ggatgggagg tttctgagat 2100

tgcttcccc catctggggc cgggggtgggt ggggtggggtc tcagtgtat ggggcctagg 2160

aaggccaagg ggatggatgc tgtagtggtg ctgtagcaca aagcaggcac ctgctacact 2220

cacttatctc ttctgtccta cagggatgtt ggagtatgag ccggccaaga ggttctccat 2280

ccgacagatt aggcagcaca ggtgagcatg gccggcctgt ctcagcctgc tgggggtctg 2340

agctgagaac atggtctcag aggtgctagg tcatcacagg agtaaggatc agtgtgtgt 2400

gtgtattgat gtctgggaag gctgtgtgtg aacttggggt gtgacagggg tgcccaatgc 2460

aggcctccct acctttatca ttttgttcag gagtgcaggc gttatgtggc ctgagaagct 2520

gtagatttca gggcctagaa ttagagacgg atcctcccat ggtggggagg gaggagtaga 2580

tggggaagtg tcactttgga tcccagctgt tccttggcca tctggacatg gaaatgtgtc 2640

tagggaggcc aacaggaagc gtgaggcatg gtgtctttcc tcacctgagg ctaagagcct 2700

tctgggtaac agtggagcct ctgtcctccc tttgtttatt taccagctgg tcagagcctt 2760

tgggtccagg cttctctgtc ctcttctccc ttcattgctag actgagactg gctcagctgg 2820

gtgtccccc gtgagggtt ctagcctatc cgtgttcaag gcgggtggga ctataggtgc 2880

agggacctga ttgccacccc tagtccaagg cgctgtggct gtcattcagt ggtggtggtt 2940

tgtgccagt ctatgggtgt taggtacct caagcctgta gccggagcac taaggcctcg 3000

tcttatgtaa ggacagccat ggtgtgggct ttggtgggta ttggccagcc gtggtcacag 3060

tgccitggcac ctgatgtctg tgctgcactt ggccttcttt agctggttcc ggaagaaaca 3120

ccctctggct gaggcgctcg tacctatccc accaagccca gacactaagg accgctggcg 3180

cagtatgact gtagtgcctt acctggagga cctgcatggc cgtgcggagg aggaggagga 3240

ggaagacttg ttgacattg aggacggcat tatctacacc caggacttca cagtgcctgg 3300

taagctggct tggcgcagct cctactggag ctggtgactt tgtgcactct ggggctggtc 3360

cccttcccaa gtctccagcc agctaacatg agccaccagg actgccaaag ccatcctggt 3420

ggctgtggca tttactctg ggctagatga agggctccct ggctgcatct agcaggagga 3480

ggggaaccct ggagggcagt gggtaggggc cctgagacag ccacctgagg gaggggtccag 3540

tggccctcgg tcctggccat gcctgacctt atatgcctt cttccccagg tgtcgaggag 3600

gcggccgagg cagggttag cgaggatgca tgcgacacat gcatgtggaa gagccagggc 3660

gcaggccttc ctggagagga gcccgaggag gggtttgggg ctttagtgta gctccctgtc 3720

tgctgcccc a ccatgtcct ccataaagct ttgtccactg tgtctgcagg tggatgcttg 3780

ccgcgacttc cctcctgtca ctaccctgac aggctcccca ccagggtttc agagaacatg 3840

cctgggtcca aggcctgagc taggtcctca gtgccagggt ggccaccagc caggggctct 3900

tggggccttt gttcctgtgg cctgcatgcc agtcccactt agctcctggc ctttcaaata 3960

gctttggtgg gagggttaagg accttgggct actgtgtctc ctgtagcaat tgagagtctt 4020

aatagcagtg cccgctgggt gccagggtgga atccacaagg acaggatatac acctgatgtc 4080

cagtatgggc cttggccaca gccctttcta aggttttaaag catccctatg tgggaatagt 4140

gtcttctact ctgtcacgtg gagcccttgt ctagactgtc ccacaggctg ggctcctggc 4200

tgagagctgg tttctctgct ggggagaaga tgtacttagg tgctggttgc atgagggacc 4260

cttaaggctg ctgtggtttg aaggaaggca agggctctggg gacactgggt ggccatggag 4320

cccatttgtc aaatggggta gtgttgca gagtgaagt accgtgctct gaggatagcc 4380

tgatccctct gtacttggca tgagggtcgg actctgcagc aacaggacag gggctttcta 4440

ctcagtcct tgtgtggagg aggggacaga tgctttctca ggtccacct gacctcaagc 4500

ctcagtccta tgcagagtga gccagagtgg gtgctgctag tgtggccaag tcagagggtt 4560

tgggagagaa attctggatc caggagcgtg ggcagtgggc tgtgtgctgg gttccacagc 4620

cgcatcgcca agcactggac tgtggagtta catgtagaca ctgacctctg gaggctggga 4680

agcttcagga gaggccatct tttgtccac tgcgagggca ggccaacaga gcaagctggt 4740

ctgcagccct cagctggatg atctccttcc cgggtgctcat cgcagctagt agctcccagg 4800

ccgaatgctt catctccttg tgctgtact gagggtctag agcctctccc ttggagagct 4860

ctgtgagctg gtgctgggct gccaggcta gacaggcagg tgagcgtggg catgctgcag 4920

gagggccagg gcatagcact gtgaaggcag tgggcctgct tgcctttgga gctactgagg 4980

ggtgggtggc accagaggct agagcacctc cgaccagcct ctgtcacagt tggggtggc 5040

tgggccctgg ggctttgagc tacctgcccc ttggctcaag ctatgcttgc catcttcccg 5100

taggacaggt cctggaagag gaagtgggtc agaattgaca gagccacagt ttgccaagg 5160

ctgtttgtgt gaatggcaca gagccccagc tcagcagcaa ggtgaagcca gaaggccgac 5220

ctggcaccgc caaccctgcg cgcaagggtg gctccagcaa caagatccgc cggctctcgg 5280

cctgcaagca gcagtgactg aggcctacag gtgggcatgg gcctgggtcc agccatccct 5340

ggtgttcaca gtgggtgtct gctgggctcc tagctccttc ccgtagggca gtgctgcaag 5400

ggggaaggct tggtggttga ggtggtacta agtgaccacc cattctacca acagtgtgtc 5460

atcaggatct ctgggcaggt gtccctgcaa ggctggggtt tccaggcctg cctgtccact 5520

cacttcggga cgttgagacc gagggcggac ctgctgcccc agaagcactt tatgtcgaga 5580

ccactggccg gccttgccctg catgccgccc tgcgagcctc gctgtctttg ggttggtttc 5640

ttttttttta ataaaacagg tggatttgag ctatggctat gaggggtgtt ggaaatatgg 5700

agcaggcggg gcacagggtg gcctgcagag aaaaccaga gcaaacaat atgcagagac 5760

atttatgatt aaccagacaa cacgaccaac cacagagggc gcagggcagg gagtgggcag 5820

gcactcacag cgagtctgcc ctatcttttg gcaataaata aagcttgga aacttg 5876

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gatgaattcc gaaggacaga ggacaaagag tgg

33

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gatgaattct tagaggtctt cttctgagat gagcttctgc tcctgctgct tgcaggccga 60

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tgcgcagctt tttcttcttg agga

24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggtgatggag tactgcgtgt g

21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ggtgaagtct cctctcccaa tggt

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

actgcagctg acccaagcca ggat

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cgaaggacag aggacaaaga gtgg

24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 11

tgcgacacat cgataccgct cgagtcg

27

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 12

aattcgactc gagcggatc gatgtgtcgc atgca

35

<210> 13

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 13

ctagtcaagc ttcataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcga attcgacctg 60

gatcccataa cttcgtatag catacattat acgaagttat caagcttcc 109

<210> 14

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 14

tcgaggaagc ttgataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatggg atccaggtcg 60

aattcgataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat gaagcttga 109

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Linker Sequence

<400> 15

gatgttcac ctcgagccca ggctccagag gtcagt

36

<210> 16

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

gatctcgaga tcgatggtac cgggtgtcca cataacttcg tatagcatatc attatacgaa 60

gttatctgtc cactgtgtct gcaggt

86

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ccggtgttcc acataacttc

20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

gtttcccaag ctttatttat tgcc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

cagcagcaag gtgaagccag aagg

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

上部は、マウスLKB1遺伝子のエキソン／イントロン構造を表す。各エキソンをボックスで示した。特にタンパクをコードする部分は斜め線のボックスで表した。下は、2つのコスミドクローンによりカバーされる領域を表す。

【図 2】

マウスLKB1遺伝子のエキソン2からエキソン10までの塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表した図である。

【図 3】

図 2 の続きである。

【図 4】

図 3 の続きである。

【図 5】

Cre-loxPシステムの応用例。黒い三角がloxP配列を表す。Creリコンビナーゼの発現により部位特異的相同組み換えが起こり、二つのタイプの遺伝子型（タイプ1、タイプ2）が得られる。

【図 6】

F23合成リンカーおよびloxP2合成リンカーの構造を示す図である。

【図 7】

相同組み換え用ベクターの模式図と、このベクターの導入により構築される遺伝子型の模式図。×印で示した領域において相同組み換えが起こり、組み換えアレルが生じる。これにCreリコンビナーゼを発現させることにより、コンディショナルターゲッティングと、コンベンショナルターゲッティングの2種類の遺伝子型が生じる。

【図 8】

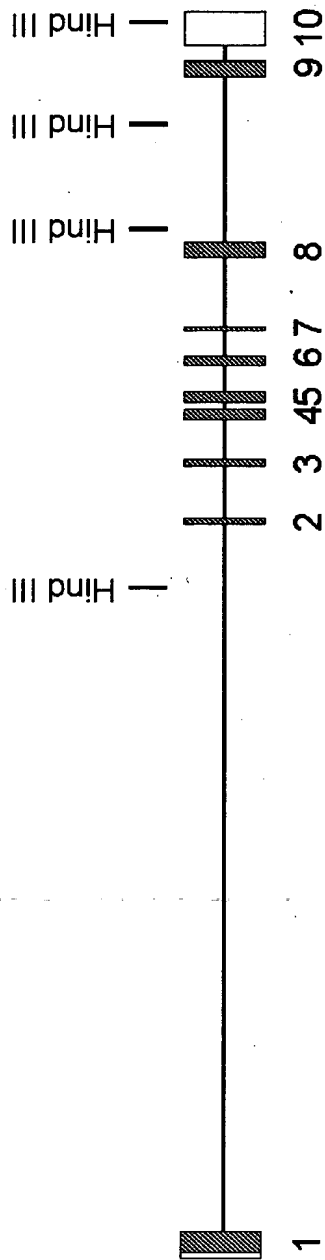
各ES細胞クローンの遺伝子型検査。PCR解析（左）及びサザンブロット解析（右）のいずれにおいても組み換え変異アレルが存在することが確かめられた。

【図9】

キメラマウスの交配によって得られたF1マウスのサザンブロットによる遺伝子型検査。右のパネルに示したマウスにおいては、正常アリルと共に変異アリルを示すバンドがみられ、ES細胞の変異アリルがF1マウスに伝達されていることが確かめられた。数字は、それぞれのマウスが由来するES細胞クローンを表す。

【書類名】 図面

【図 1】



クローン072



断片1
断片2
断片3
断片4

クローン243



【図 2】

GGAGATCCAGCTGCTGCGGCGGCTGCGGCATCGGAATGTGATCCAGCTTGTGGACGTGCTGTACAATGAGGAGAAGCAGA
 AGATatatacctgtgggtggagtgggctggggtggccctgtgttagggctggaagccttctgcaaggcctctggcagca
 atagtgtacatgtcatcctgtgggtgctgtcagctcatcaggcagggagcaaggcatggggcttccacctggtgccag
 cctgttctgagcagtgtggctgggactgggcatggcctcacagggacttggggcctatgtacattgacagggccccggct
 ggttctagaggtttccatgtgtcccttcccagaggtagaggttgacagcctacgttgcatctgggcagtcctgggagc
 attctgagaaccagtgccctgcagcccaactcctggtaccatctctccctgtggctagtacaccagctgatttcagt
 cctgttgtaatctatgtgactccatgtggtccaagtcaactgtggtggtcttgtggaccctgtgagtactgataggagc
 gcagaatggcgggagagcagagtgggtgggtgctgttggcccagcggggccctccagaccactgttgctaggagcagggc
 tcctgggcttgggtgtgtgttcttccctagcgccctacGTATATGGTGTGAGTACTGCGTATGTGGCATGCAGGAGATG
 CTGGACAGTGTGCGGAGAAGCGCTTCCCTGTGTGCCAAGCTCATGGtgagtgcctgctgggtgcaggaggagcagcc
 attgtcaggaaaccaggtgttctgggccccagtttttaaccagccaatgtgcttagggttaccctcttgttaggcc
 ctgtggtcccgtgcccctgcagagccatagtgggtctgagtcctgttcagtgtcccaggttcagcagaatcacatcccc
 tggtagcagagaacaaagggaagggaagggaaggcaagccagaggggaaacctggctccctgggctgggcagcag
 tgactgccagttgccctgtgtaatttttagtggcccagcctctgactctcaggtctgtttgctgagccctaaacatcta
 tcacctgttaggccaggtctcatgagctctccaaacttcatacagacttatgttaggtaccatggtatgggctgagacac
 tgtggggcctgagccagtcacccattcagTACTTCCGCCAGCTGATTGACGGCCTGGAATACCTACACAGCCAGGGC
 ATTGTTCAACAAGGACATCAAGCCGGGCAACCTGCTACTCACCACCAATGGCACACTCAAGATCTCCGACCTCGGTGTTGC
 CGAGgtaggccatgtgcagggatcatgggcccgttctcctgagctgccctgactctcactgccctgcagGCCCTGCAC
 CCTTTCGCTGTGGATGACACCTGCCGACAAGCCAGGGCTCCCCGGCCTCCAGCCTCCTGAGATTGCCAATGGACTGGA
 CACCTTTTCAGGTTTCAAGGTGGACATCTGGTCAGCTGGGGTCACACTgtaagtgtcttgtgtgtaccctgtagcagatg
 ggggctgtgggttttccctagtgttcttgggcctttttgcccacagtggtgtggctagcaggttggacattccaggtctg
 tgggtgtggttctcaccctacccacccactccacagggttttgcttgacacagatgtaggtgccatgactgcacat
 ctaccagttaacatgtgtcctgtctgggagttggggcacctgtcctctggtctccagtgtggccagcactgacactcttt
 tcctatgtgaagTTACAACATCACCACGGGCTGTACCCATTGAGGGGGACAATATCTACAAGCTCTTTGAGAACATTG
 GGAGAGGAGACTTACCATCCCTTGTGACTGCGGCCCCACCACTCTCTGACCTACTCCGAGgtgggcatctctaaatcacc
 caaatgttaggacagcaaggacagagcccctggtctggagggttctgacctactgtcaggacagccttctccgccca
 ggatgggaggtttctgagattgcttcccccatctggggccgggtgggtgggtgggtctcagtgtatggggcctagg
 aaggccaaggggatggatgctgtagtgtgtgtgtagcacaagcaggcacctgtacactcacttatctctctgtccta
 cagGGATGTTGGAGTATGAGCCGGCCAAGAGGTTCTCCATCCGACAGATTAGGCAGCACAGgtgagcatggccggcctgt
 ctccagctgtgggggtctgagctgagaacatggtctcagaggtgttaggtcatcacaggagtaaggatcagtgtgtgt
 gtgtattgatgtctgggaaggtgtgtgtaacttgggtgtgacagggtgccaatgcaggcctccctacctttatca
 ttttgttcaggagtgcaggcgttatgtggcctgagaagctgtagatttcagggcctagaattagagacggatcctcccat
 ggtggggaggaggagtagatgggaagtgtcactttggatcccagctgttccctggccatctggacatggaaatgtgtc

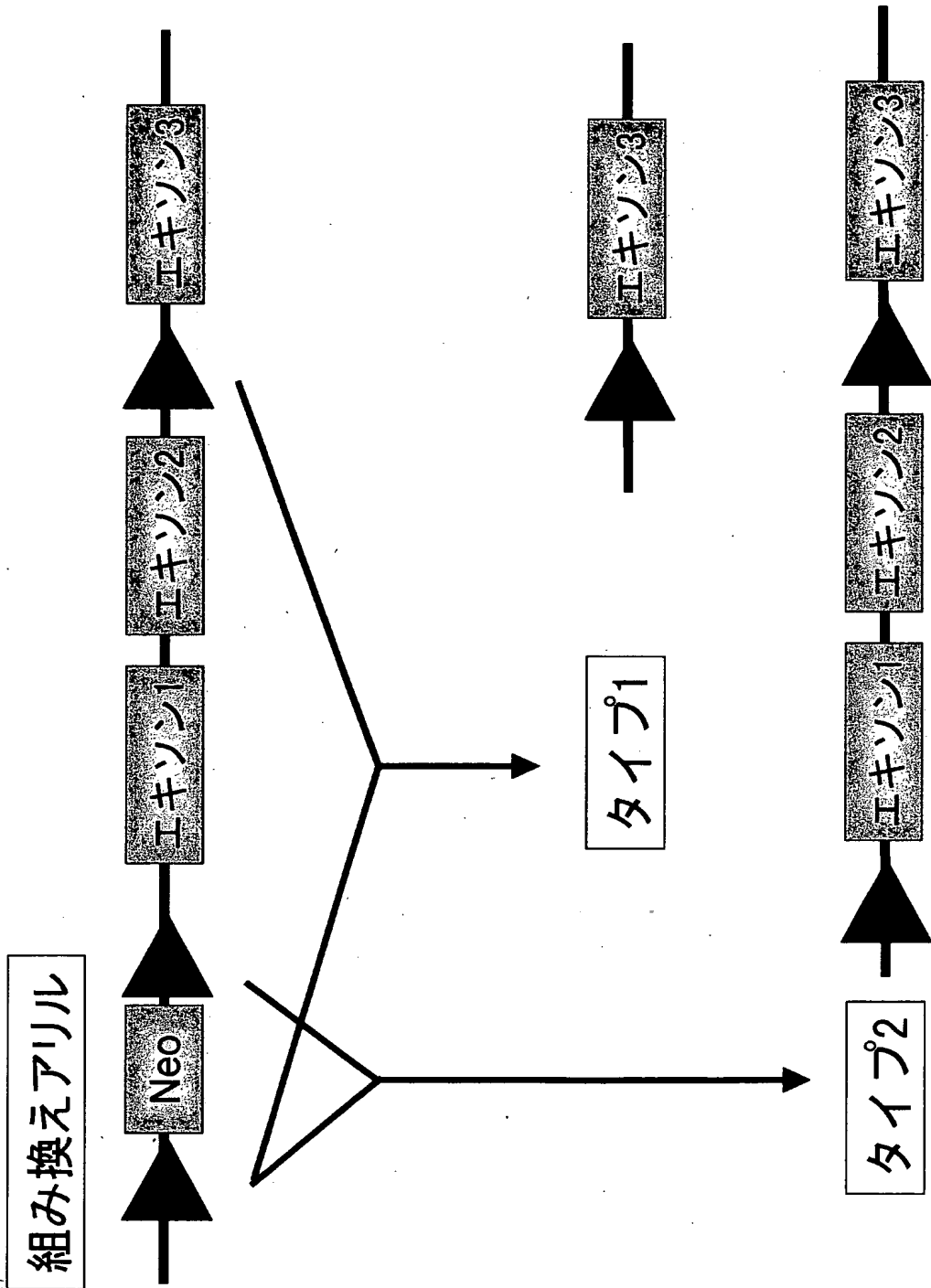
【图 3】

tagggaggccaacaggaagcgtgaggcatgggtgtctttcctcacctgaggctaagagccttctgggtaacagtggagcct
ctgtcctccctttgtttatttaccagctgggtcagagcctttgggtccaggcttctctgtcctcttctcccttcatgctag
actgagactggctcagctgggtgtccccagtgagggttctagcctatccgtgttcaaggcgggtgggactataggtgc
agggacctgattgccaccctagtcgaagcgctgtggctgtcatcagtgggtgggtgttgtgccagtgtatgggtgt
taggctacctcaagcctgtagccggagcactaaggcctcgtcttatgtgaaggacagccatgggtgtgggctttgtgggta
ttggccagccgtgggtcacagtgcctggcacctgatgtctgtgctgcacttggccttcttttagCTGGTTCCGGAAGAAACA
CCCTCTGGCTGAGGCGCTCGTACCTATCCCACCAAGCCCAGACACTAAGGACCGCTGGCGCAGTATGACTGTAGTGCCCT
ACCTGGAGGACCTGCATGGCCGTGCGGAGGAGGAGGAGGAAGACTTGTGTTGACATTGAGGACGGCATTATCTACACC
CAGGACTTCACAGTGCCTGtaagctggcttggcgagctcctactggagctgggtgacttgtgcactctggggctggtc
cccttcccaagtctccagccagctaacatgagccaccaggactgccaagccatcctgggtggctgtggcatttactctg
ggctagatgaagggtccctggctgcatctagcaggaggagggaacccctggagggcagtgggtagggccctgagacag
ccacctgagggagggtccagtggccctcggtcctggccatgcctgacctatatacgcttcttcccagggtgtcgaggag
gccccgaggcagggtttagcaggatgcatgcgacacatgcatgtggaagagccagggcgagcccttctggagagga
gccccgaggagggtttagggctttagttagctccctgtctgctgccccacccatgtcctccataaagctttagtccactg
tgtctgcagggtgatgttgcgcgacttccctcctgtcactacctgacaggtccccaccagggtttagagaacatg
cctgggtccaagcctgagctaggctcctcagtgccagggtggccaccagccaggggcttctggggcctttagtctctgtg
cctgcatgccagtcccacttagctcctggcctttcaaatagctttagtgggagggtgaaggaccttgggctactgtgtctc
ctgtagcaattgagagttctaatagcagtccccgctgggtgccagggtggaatccacaaggacaggtatacacctgatgtc
cagtatgggccttggccacagccctttctaaggtttaagcatccctatgtgggaatagtgcttctactctgtcacgtg
gagcccttgtctagactgtcccacaggctgggtcctggctgagagctggtttctctgtctggggagaagatgtacttagg
tgctggttgcagtagggacccttaaggctgtgtggttgaaggaaggcaagggtctggggacactggttggccatggag
cccatttgtcaaatgggtagtgttgacagagtgaagtgacctgtctgaggatagcctgatccctctgtacttggca
tgagggtcggactctgcagcaacaggacaggggttctactcagtgcccttgtgtggaggaggggacagatgctttctca
gagtcacctgacctcaagcctcagtcacctgacagagtgggtgtgtctagtgtggccaagtcagagggtt
tgaggagagaaatttggatccaggagcgtgggcagtgggctgtgtgctgggttccacagccgacattgccaagcactggac
tgtggagttacatgtagacactgacctctggagcctgggaagcttcaggagaggccatctttgtcccactgagaggga
ggccaacagagcaagctggtctgcagccctcagctggatgatctccttcccgggtgtcatcgagctagtagctcccagg
ccgaatgcttcatctccttgtgcctgtactgagggtctagagcctctcccttggagagctctgtgagctgggtgtgggt
gcccaggctagacaggcaggtgagcgtgggcagtgctgcaggaggggccagggtatgactgtgaaggcagtgggcctgt
tgcctttaggactactgaggggtgggtggcaccagaggctagagcacctccgaccagcctctgtcacagttggggctggc
tgggccctggggctttagctacctgccccttgggtcaagctatgcttgccatcttcccgtagGACAGGTCCTGGAAGAG
GAAGTGGGTGAGAATGGACAGAGCCACAGTTTGCCCAAGGCTGTTGTGTGAATGGACAGAGCCCCAGCTCAGCAGCAA
GGTGAAGCCAGAAGGCCGACCTGGCACCGCCAACCTGCGCGCAAGGTGTGCTCCAGCAACAAGATCCGCCGGCTCTCGG
CCTGCAAGCAGCAGTGACTGAGGCCTACAGgtgggcagtgggcctgggtccagccatccctgggtttcacagtgggtgtct
gctgggctcctagctccttcccgtagggcagtgctgaagggggaaggtctggtggttaggtggtactaagtaccacc
cattctaccaacagTGTGTCATCAGGATCTCTGGGCAGGTGTCCCTGCAAGGCTGGGTTTTCCAGGCCTGCCTGTCCACT

【図 4】

CACTTCGGGACGTTGGAGCCGAGGGCGGACCTGCTGCCCCAGAAGCACTTTATGTCGAGACCACTGGCCGGCCTTGCCTG
CATGCCGCCCTGCCAGCCTCGCTGTCTTTGGGTTGGTTTCTTTTTTTTAATAAAACAGGTGGATTTGAGCTATGGCTAT
GAGGGTGTTTGGAATATGGAGCAGGCGGGGCACAGGGTGGCCTGCAGAGAAAACCCAGAGCAAACAAATATGCAGAGAC
ATTTATGATTAACCAGACAACACGACCAACCACAGAGGGCGCAGGGCAGGGAGTGGGCAGGCACTCACAGCGAGTCTGCC
CTATCTTTTGGCAATAAATAAAGCTTGGGAAACTTG

【図 5】



【図 6】

F23 合成リンカー

5' tgcgacacatcgataccgctcgagtcg 3'

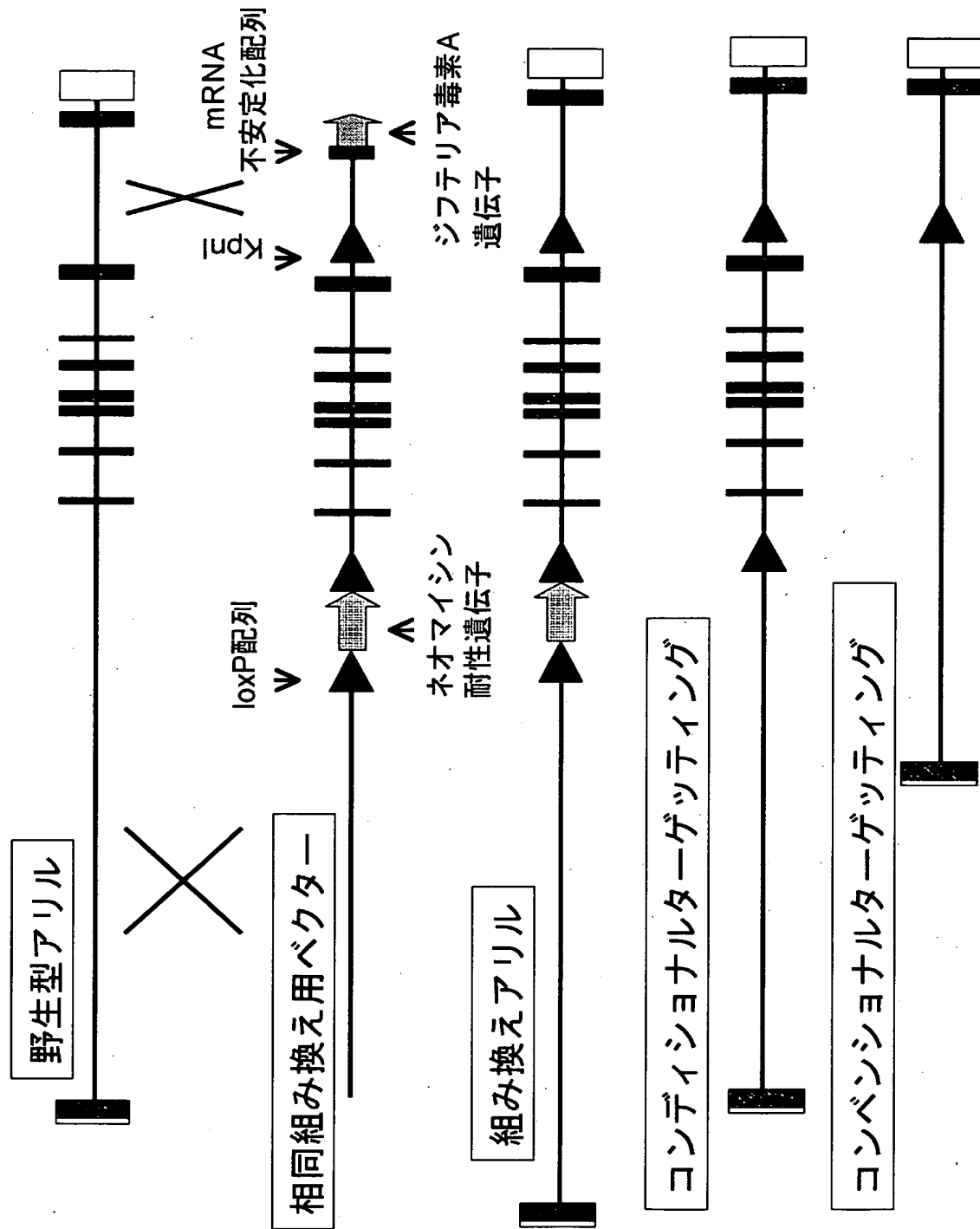
3' acgtacgctgtgtagctatggcgagctcagcttaa 5'

AvaIII ClaI XhoI EcoRI

loxP2 合成リンカー

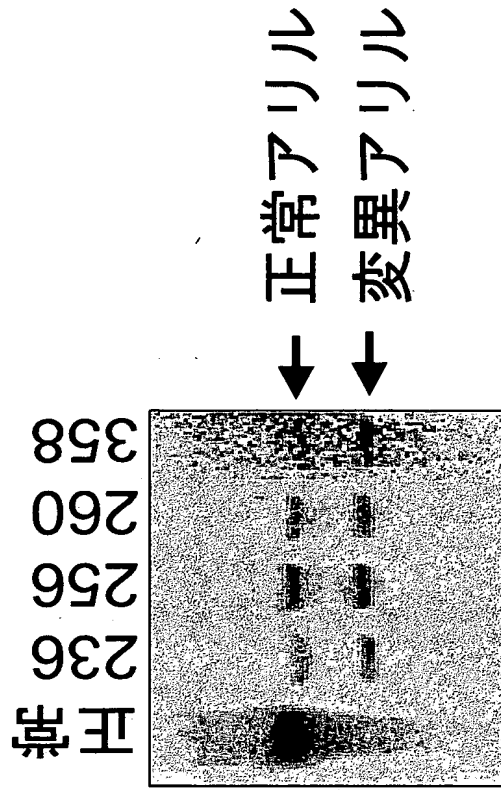
SpeI	HindIII	loxP ->	EcoRI	BamHI	loxP ->	HindIII	XhoI
5'	ctagtcgaagcttcaatacttgatagcattatagcaagtcgaatcgacctggatccataacttggtagatagcattatagcgaagtattatcaagcttcg	3'					
3'	agtcgaagtcgaagcattcgtagtaataatgcttcaatagctgaagctggactagggtattggacatatactgtaataatgcttcaatagtcgaaggaagtc	5'					

【図 7】

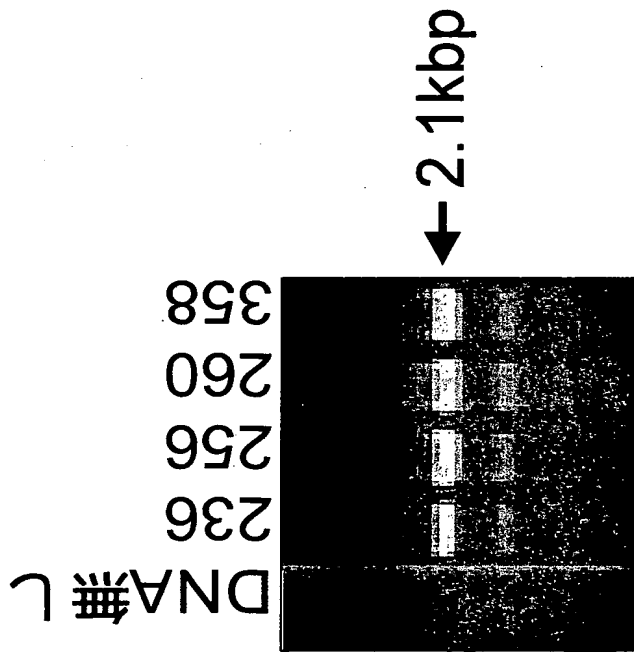


【図 8】

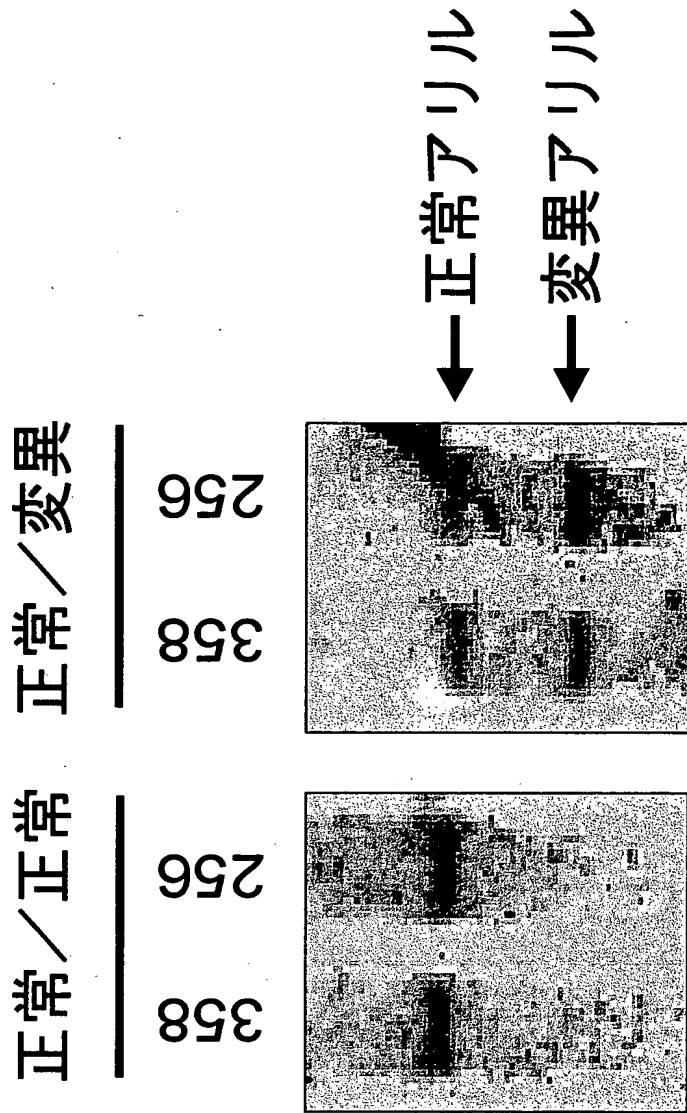
サザンブロット解析



PCR解析



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 LKB1遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 LKB1遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊しうる哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物は、ポイツ・イエーガー症候群や、その他癌などのLKB1遺伝子の欠損に基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発の為にツールとして非常に有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日	1996年 7月15日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名	株式会社中外分子医学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社